



董丹,张涛涛,王进福,等.生防菌 MHZ111 的鉴定及对黄瓜根结线虫病的防治效果评价[J].黑龙江农业科学,2022(11):31-35.

生防菌 MHZ111 的鉴定及对黄瓜根结线虫病的防治效果评价

董 丹,张涛涛,王进福,刘 隽

(北京市农林科学院 植物保护研究所,北京 100097)

摘要:为促进生防菌株的进一步开发利用,从漠河永冻层土壤中分离到菌株 MHZ111,利用形态学和 ITS、18S rDNA 序列分析进行种类鉴定,并利用室内离体活性试验、盆栽和田间试验研究了该菌株对黄瓜根结线虫的防治效果。结果表明,菌株 MHZ111 为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*),该菌株发酵液原液对根结线虫二龄幼虫的校正死亡率达 100%,在盆栽试验中防效达 71.3%,在田间试验中防效达 70.3%。产紫青霉 MHZ111 菌株在黄瓜根结线虫病的绿色防控上具有良好的开发应用前景。

关键词:黄瓜根结线虫;生物防治;产紫青霉;防治效果

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是一类重要的植物病原线虫,在世界各地均有分布,寄生范围超过 3 000 种,是设施农业生产中重要的土传病害。根结线虫常寄生于各种高等植物根系,可影响被侵染植物正常的生理生化活动和生长发育,进而影响产量及品质。据统计,根结线虫在我国每年带来的经济损失达 4 亿美元^[1],但目前,对根结线虫的防治手段仍以化学杀线剂为主,新型杀线剂开发少、能选择的范围窄,而化学杀线剂则严重威胁蔬菜安全、人类健康及生态环境,因此挖掘安全高效的生防资源、开发生物杀线剂日益受到关注^[1]。

真菌种类繁多,代谢物丰富多样,是寻找新药的宝贵资源库。食线虫真菌凭借无污染、对人畜无毒、持效期长等优势成为研究人员关注的焦点,目前全球已报道的食线虫真菌达到了 700 多种^[2]。已有研究发现绿色木霉(*Trichoderma viride*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)对黄瓜根结线虫具有显著防效^[1,3];黄阔等^[4-5]发现淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)对烟草根结线虫的防控具有极佳的防效;文才艺等^[6]发现黑曲霉(*Aspergillus niger*)对番茄根结线虫的防控具有显著防效。本研究从漠河永冻层土壤中分离并筛选到杀线虫活性较高的真菌菌株 MHZ111,对其进行了种类鉴定,并利用温室盆栽试验和田间试

验评价了该菌株对南方根结线虫的防治效果,为其进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

南方根结线虫由北京市农林科学院植物保护研究所生防微生物研究室分离鉴定并保存,用于接种的 2 龄幼虫在空心菜上扩繁,选取成熟线虫卵用 0.5% 的次氯酸钠溶液消毒 3 min,用无菌水冲洗 3 次后放入加有滤网的直径 90 mm 培养皿中,加灭菌蒸馏水于 25 ℃ 孵化,48 h 后从筛网下收集孵化的 2 龄线虫(J2)用于试验。

MHZ111 菌株是从黑龙江省漠河永冻层土壤悬液中用梯度平板稀释法分离获得,菌株保藏号为 CGMCC No. 11630。供试黄瓜为中农 16 号,购于京研益农(北京)种业科技有限公司。10% 噻唑膦颗粒剂(福气多)购于市场。

1.2 菌株 MHZ111 的鉴定

1.2.1 菌株 MHZ111 的形态学鉴定 将菌株 MHZ111 进行单孢纯化后,转接到马丁培养基上观察菌落形态、颜色及培养性状,然后挑取菌丝放于显微镜下,观察菌丝及分生孢子特征^[7],再综合培养性状按照 Bissett 分类方法进行形态学鉴定^[8]。

1.2.2 菌株 MHZ111 的分子生物学鉴定 将纯化的 MHZ111 菌株,接到 PDB 中 25 ℃,180 r·min⁻¹ 摇瓶培养 5 d,收集菌丝体及孢子,加入 FPCB 裂解液(上海生工股份有限公司),反复冻融^[1],然后用 CTAB 法^[9]提取基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,分别用真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'、ITS2 (5'-

收稿日期:2022-06-02

基金项目:北京市农林科学院科技创新能力专项(KJCX 20200426,KJCX20200110)。

第一作者:董丹(1981—),女,硕士,助理研究员,从事根结线虫生防资源研究与应用。E-mail:dan20080801@163.com。

通信作者:刘霆(1975—),男,博士,副研究员,从事作物根结线虫病害生物防治。E-mail:ltting11@163.com。

GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')和18S rDNA通用引物 NS1(5'-CCA GTAGTCATGCTTGTCTC-3')、FR1(5'-AICCATTC AATCGGTAIT-3')进行 rDNA-ITS 和 18S rDNA 片段序列扩增。PCR 扩增程序为:rDNA-ITS 片段 94 °C 预变性 2 min,(94 °C 45 s,37 °C 1 min,72 °C 2 min)×35 个循环,72 °C 再延伸 10 min;18S rDNA 片段 94 °C 预变性 5 min,(94 °C 30 s,55 °C 1 min,72 °C 1.5 min)×35 个循环,72 °C 再延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化,引物合成及 PCR 序列测定委托北京博迈德基因技术有限公司完成。将菌株的 ITS 和 18S rDNA 序列分别提交至 NCBI,通过 BLAST 序列比对,从 DNA 水平鉴定 MHZ111 菌株的种类。

1.3 菌株 MHZ111 对黄瓜根结线虫的防治效果

1.3.1 菌株 MHZ111 发酵液室内杀线虫活性

取在 PDA 培养基上培养 5 d 的 MHZ111 平板,用灭菌打孔器均匀地打取孔径为 0.5 cm 的菌饼,接种至含 100 mL PDB 培养基的三角瓶中,每瓶接入 3 个菌饼,25 °C,200 r·min⁻¹ 摇瓶发酵 72 h,发酵液 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,再用微孔滤膜滤出菌丝,获得的发酵滤液用于室内杀线虫活性试验^[1]。将 200 μL 发酵滤液分别放入 24 孔细胞培养板中,每孔加入 100 μL 根结线虫 2 龄幼虫(J2)悬浮液(20 条线虫左右),以清水作为对照,3 次重复。室温处理 24 h 观察线虫存活情况,将虫体僵直的 J2 分离出来,放入 2% 生理盐水中,在体视显微镜下用竹针轻轻拨动 J2,死亡的个体将完全不动^[3],计算线虫校正死亡率^[10]。

1.3.2 菌株 MHZ111 防治根结线虫的盆栽试验

取菌株 MHZ111 的 PDA 菌饼 3 个接种于含 100 mL PDB 培养基的 500 mL 三角瓶中,25 °C,200 r·min⁻¹ 摇瓶发酵 72 h 得到 MHZ111 发酵液,将 MHZ111 发酵液以 10% 的接种量接种于灭菌的 250 g·袋⁻¹ 的固体培养基(玉米碴 40%,玉米芯 45%,水 15%)中,25 °C,发酵 10~15 d,待 MHZ111 孢子含量达到 2×10^8 个·mL⁻¹ 时用于盆栽试验。

黄瓜育苗于直径 13 cm、高 10 cm 的营养钵中,育苗土为草炭土:蛭石按 2:1 比例混合,每盆装入混合基质 150 g。在黄瓜第 1 片真叶完全展开时接种南方根结线虫,将已培养好的线虫配制成 500 条·mL⁻¹ 的线虫悬浮液,在距离黄瓜根部 2 cm 处的基质中打 3 个小孔,将线虫悬浮液混匀后加入小孔中,每盆接种 3 mL 约有 1 500 条线虫^[11]。接种当天进行药剂处理,菌株 MHZ111

固体发酵物 150 kg·hm⁻²,10% 噻唑膦颗粒剂 20 kg·hm⁻² (CK2),设置接种线虫但不用药剂处理的黄瓜幼苗作为空白对照(CK1),每个处理 15 株,3 次重复。药剂处理方法为:菌株 MHZ111 固体发酵物和噻唑膦颗粒剂拌土后均匀撒施,施药后每盆浇等量的水,以不渗漏为准,然后放置在温室中培养,并正常进行田间管理。在接种线虫 45 d 后观察根部症状,根据根部根结数和大小,统计根结数,计算防治效果^[1],并采用 SPSS 22.0 软件完成数据统计分析。

1.3.3 菌株 MHZ111 防治根结线虫的田间试验

田间防效试验在北京顺义区绿奥试验基地进行,选择根结线虫病发生较重,但上茬没有得到有效防治的温室地块进行。试验前,对地块土壤进行多点随机取样,通过过筛法及水盘法分离收集根结线虫卵块和 J2,确定土壤中根结线虫的数量^[12],选择根结线虫分布均匀的地块开展试验^[7]。

菌株 MHZ111 固体发酵物制备方法同盆栽试验,将孢子终浓度稀释至 1×10^8 个·mL⁻¹ 进行田间试验。将 MHZ111 固体发酵物通过穴施法直接施入土壤,用量为 150 kg·hm⁻²,以 10% 噻唑膦颗粒剂处理为药剂对照,用量为 20 kg·hm⁻²,轻轻覆土后,把 1 株 1 叶期黄瓜苗移栽到穴内,以不用药剂处理的黄瓜苗为空白对照^[1]。试验采用随机区组法设计,每个小区双行种植,每行 25 株,覆膜栽培,株距 30 cm,行距 50 cm。各处理重复 3 次,田间实行统一的管理措施,以保证生长环境一致^[13]。移栽 60 d 后调查,调查方法参照根结线虫田间调查方法进行,每个处理选择 30 株调查根部发病情况,根据根部根结的数量和大小,记录病情级别^[1],计算出根结指数(GI)以明确防治效果,数据用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

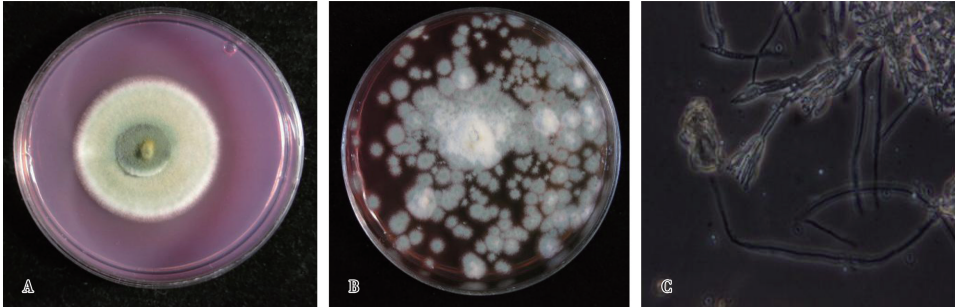
2.1 菌株 MHZ111 形态学及分子生物学鉴定

2.1.1 形态学鉴定 菌株 MHZ111 在马丁培养基上生长迅速,初期菌落呈圆形,在边缘产生白色菌丝,后渐变为绿色,且产孢量较大(图 1A、B)。显微镜下观察发现 MHZ111 菌丝有横隔,在分生孢子梗顶端产生几轮对称或不对称的小梗,状似扫帚,分生孢子呈球形或椭圆形(图 1C)。鉴于分生孢子梗和菌落等典型形态特征,初步鉴定菌株 MHZ111 是青霉属真菌。

2.1.2 分子生物学鉴定 以菌株 MHZ111 的基因组 DNA 为模板,用引物 ITS1、ITS2 和 NS1、FR1 分别进行 rDNA-ITS 和 18SrDNA 序列扩

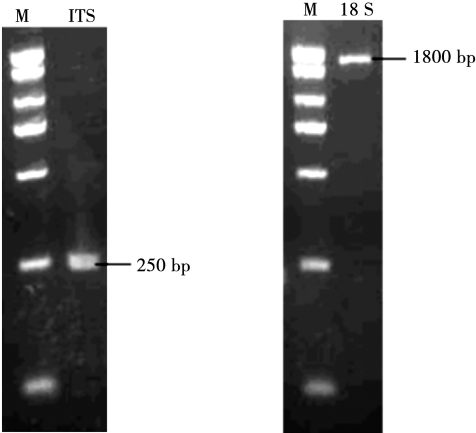
增,分别得到了 250 bp 左右和 1 800 bp 左右的片段(图 2),而后测序获得 rDNA-ITS 序列和 18SrDNA 序列。将得到的这两个序列与 GenBank 数据库中的已知青霉属进行 BLAST 比对, MHZ111 的 ITS 序列与 *Penicillium purpurogenum* ITS 序列 JQ422620.1、JQ422619.1 相似性达到

100%,18SrDNA 序列与 *Penicillium purpurogenum* 18SrDNA 序列 AF245268.1 相似性达 100%,选取与之同源性较高的序列,利用软件 MEGA5.0 构建系统发育树^[14]。结合培养性状、形态特征和系统发育树,将 MHZ111 菌株鉴定为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)。



A.菌落初期; B.培养5 d的菌落; C.菌丝、分生孢子梗、孢子。

图 1 菌株 MHZ111 的形态学特征



M.DNA marker 2000。

图 2 菌株 MHZ111 ITS 及 18S 序列扩增
琼脂糖凝胶电泳检测

2.2 产紫青霉 MHZ111 对根结线虫的防治效果

2.2.1 产紫青霉 MHZ111 发酵液室内杀根结线虫效果 用发酵液处理根结线虫 2 龄幼虫, 24 h 后线虫虫体僵直,将线虫转移到 2%生理盐水中,在体视显微镜下用竹针轻轻拨动,线虫仍僵直不动,无法恢复活性(图 3A),而对照组的线虫活性正常(图 3B)。统计发现产紫青霉 MHZ111 发酵液对根结线虫的平均校正死亡率达到了 100%。

2.2.2 产紫青霉 MHZ111 在盆栽试验中对黄瓜根结线虫的防治效果 在接种南方根结线虫 45 d 后对黄瓜进行根结线虫病害调查,在空白对照中,黄瓜苗根结大、数量多,根结较均匀地分布在 整个根系,平均单株根结数为 204.6 个(图 4A),

产紫青霉 MHZ111 处理的黄瓜根系长,须根多,根色洁白,根部根结小,数量少,平均单株根结数为 58.8 个(图 4B),防治效果为 71.3%。在 10%噻唑膦药剂处理中黄瓜根系长,根结小而少,平均单株根结数为 35.6 个(图 4C),防治效果为 82.6%。通过方差分析发现,产紫青霉菌处理、噻唑膦处理及空白对照间根结数存在显著差异,产紫青霉 MHZ111 对根结线虫有较好的防治效果,但与噻唑膦的防治效果仍存在一定差异(表 1)。



A.无菌水对照; B.产紫青霉MHZ111发酵液处理。

图 3 产紫青霉 MHZ111 发酵液对根结线虫的作用



A.空白对照; B.产紫青霉MHZ111处理; C.噻唑膦处理。

图 4 产紫青霉 MHZ111 对黄瓜根结线虫的盆栽防治效果

表 1 产紫青霉 MHZ111 对黄瓜根结线虫的防治效果

处理	盆栽试验		田间试验	
	单株平均 根结数量/个	防治 效果/%	平均 根结指数	防治 效果/%
CK	204.6 a	-	92.0 a	-
产紫青霉 MHZ111	58.8 b	71.3	27.3 b	70.3
噻唑膦	35.6 c	82.6	25.3 b	72.5

注:同列不同小写字母表示在 $P\leq 0.05$ 水平差异显著。

2.2.3 产紫青霉 MHZ111 对黄瓜根结线虫的田间防治效果 药剂处理 60 d 后,每个处理选取 30 株调查根部发病情况,将黄瓜根系挖出,抖落根际上的泥土,参照病情级别标准调查根结线虫发病情况。其中,对照组黄瓜根结明显,根结数量多,

90%植株病情级别达到了 4 级(图 5A),根据根结指数计算公式,对照的平均根结指数为 92.0。产紫青霉 MHZ111 菌处理的黄瓜发病轻,根结数量较少且根结较小,85%的植株病情级别小于等于 2 (图 5B),3 次试验中,产紫青霉 MHZ111 菌的平均根结指数为 27.3,平均防治效果为 70.3%。而在噻唑膦处理中,黄瓜根系上根结小数量少,根结覆盖率小于 20%,75%的植株病情级别为 1 级(图 5C),3 次试验中平均根结指数达到 25.3,平均防治效果为 72.5%。通过方差分析发现,产紫青霉菌处理、噻唑膦处理均与空白对照间根结指数存在显著差异,产紫青霉 MHZ11 与噻唑膦处理间根结指数没有显著差异,防治效果接近(表 1)。



A.空白对照; B.产紫青霉MHZ111处理; C.噻唑膦处理。

图 5 产紫青霉 MHZ111 对黄瓜根结线虫的田间防治效果

3 讨论

产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)是习居于土壤的一种真菌,相关研究报道较少。前人从海泥中分离到该菌,并采用超声诱变和超声介导的卡那霉素抗性筛选技术对无活性野生株产紫青霉 G59 进行活性转化,筛选获得了对 K562 细胞具有显著抗肿瘤活性的 4 株突变株^[15-19]。也有研究人员从红树林土壤中分离到该菌,对其产纤维素酶培养基及发酵条件进行了深入研究^[20-21]。另有研究者对该菌产 β -葡萄糖醛酸苷酶产酶诱导

工艺和菊粉酶产酶发酵培养基进行了研究^[22-24]。产紫青霉是一种新的生防资源,目前除本实验室外,尚未见到关于该菌对植物寄生线虫的活性以及在植物寄生线虫生物防治和应用方面的研究。本试验中产紫青霉 MHZ111 固体发酵物对根结线虫具有较强的致死作用,在盆栽试验和田间试验中对黄瓜根结线虫病的防效均达到了 70%,防效比较稳定。通过盆栽和田间试验对比发现,在盆栽试验中产紫青霉 MHZ111 防效不及噻唑膦,但在田间试验中两者差异不显著,分析原

因可能是,在盆栽试验中土壤使用购买的育苗基质,本底简单,试验时间短,化学药剂不易降解,而田间试验为自然土壤,富含大量的微生物,本底复杂,试验时间长,对降解化学药剂产生了一些影响,也影响了防治效果。本试验新分离到的产紫青霉 MHZ111,虽然丰富了黄瓜根结线虫病的生防资源,但仍有很多因素制约着它的研究应用,如在不同土壤中防效如何稳定、在各种作物根部定殖能力怎样、杀线虫的主要活性成分是什么、作用机制又是什么等问题均有待于进一步研究。

4 结论

本研究从漠河永冻层土壤中分离到一株性状良好的真菌菌株 MHZ111,经形态学和分子生物学鉴定为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)。其发酵液对南方根结线虫二龄幼虫致死率达 100%,通过温室盆栽试验和田间试验,发现 MHZ111 处理的黄瓜苗根结少,对根结线虫具有很好的防治作用,防效达 70%,具有良好的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 翟明娟,李登辉,马玉琴,等.绿色木霉菌株 Tvir-6 对黄瓜根结线虫的防治效果研究[J].中国蔬菜,2017(10):67-72.
- [2] 张颖,李国红,张克勤.食线虫真菌资源研究概况[J].菌物学报,2011(6):836-845.
- [3] 马金慧,朱萍萍,郝振川,等.哈茨木霉菌株 TRI2 的鉴定及其对黄瓜根结线虫的防治作用[J].中国农学通报,2014(22):263-269.
- [4] 黄阔,李石力,张永强,等.不同微生物菌剂对烟草根结线虫病控制效果研究[J].植物医生,2019(6):28-33.
- [5] 黄阔.烟草根际微生物与根结线虫发生的关系及调控作用研究[D].重庆:西南大学,2020.
- [6] 文才艺,雷震,刘霆,等.黑曲霉 Y-61 代谢活性物质对南方根结线虫的作用[J].江苏农业科学,2010(6):157-159.
- [7] 马金慧.刺角黄瓜对南方根结线虫抗性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2014.
- [8] BISSETT J. A revision of the genus *Trichoderma*. II.

Infrageneric classification[J]. Canadian Journal of Botany, 1991,69:2357-2372.

- [9] 曹宜,刘波,林营志,等.枯萎病尖孢镰刀菌的 RAPD-PCR 多态性分析[J].厦门大学学报(自然科学版),2004(S1):74-79.
- [10] 段玉玺,靳莹莹,王胜君,等.生防菌株 Snef85 的鉴定及其发酵液对不同种类线虫的毒力[J].植物保护学报,2008(2):132-136.
- [11] 刘洋,段玉玺.4 种杀线虫剂对黄瓜根结线虫病的防治效果[J].河南农业科学,2011,40(1):94-96.
- [12] 方中达.植物研究方法[M].3 版.北京:中国农业出版社,1998:307-324.
- [13] 杨明星.生防菌种农剂的研制及其对南方根结线虫的防治效果[D].秦皇岛:河北科技师范学院,2016.
- [14] 焦俊,韩冰洁,王媛媛,等.毒杀南方根结线虫的木霉种类鉴定及活性研究[J].植物保护,2015,41(2):64-69.
- [15] 吴长景,崔彬彬,田从魁,等.产紫青霉 G59 的两株突变株新产抗肿瘤活性产物研究[J].国际药学研究杂志,2010(2):122-126.
- [16] 卜秀嫣,崔彬彬,李长伟.产紫青霉 G59 的超声诱变活性突变株新产抗肿瘤活性产物[J].军事医学科学院院刊,2010(5):423-426,475.
- [17] 柴云晶.产紫青霉 G59 的庆大霉素抗性筛选与突变株新产抗肿瘤活性产物研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2011.
- [18] 房士明.产紫青霉 G59 的两株硫酸二乙酯诱变突变株 BD-1-6 和 BD-1-3 新产抗肿瘤产物研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2012.
- [19] 易乐.海洋来源产紫青霉 G59 的新霉素抗性突变株 4-30 新产抗肿瘤活性产物研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2016.
- [20] 王一多.红树林产紫青霉 HBZ003 纤维二糖水解酶的分离纯化及其基因克隆[D].海口:海南大学,2013.
- [21] 王春燕,刘四新,高阳,等.红树林土壤纤维素酶产生菌筛选及产酶条件研究[J].食品与生物技术学报,2011(1):144-150.
- [22] 郭晓晓,王小艳,冯世江,等.产紫青霉中 β -葡萄糖醛酸苷酶的诱导表达[J].生物加工过程,2012(3):28-32.
- [23] 宋占科,王小艳,陈国强,等.产紫青霉 β -葡萄糖醛酸苷酶基因的克隆与原核表达[J].化工学报,2008(12):3101-3106.
- [24] 张介驰,于德水,奚新伟,等.碳源对产紫青霉产菊粉酶的影响[J].生物技术,2001(1):28-29.

Identification of Biocontrol Strain MHZ111 and Its Control Effect Against Cucumber Root Knot Nematode

DONG Dan, ZHANG Tao-tao, WANG Jin-fu, LIU Ting

(Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to promote the further development and utilization of biocontrol strains, strain MHZ111 was isolated from the permafrost soil in Mohe. The strain was identified by morphology, ITS and 18S rDNA sequence analysis. Its control effect against cucumber root-knot nematode was evaluated through *in vitro* activity tests, pot and field experiments. The results showed that strain MHZ111 was identified as *Penicillium purpurogenum*. The relative mortality of the fermentation of the strain to *Meloidogyne incognita* J2 was as high as 100%, the biocontrol effect was 71.3% in pot experiment, and 70.3% in field experiment. *Penicillium purpurogenum* MHZ111 strain had a great potential for the green control of cucumber root knot nematode.

Keywords: cucumber root knot nematode; biological control; *Penicillium purpurogenum*; control effect